

# ExCell Bio

## 热启动 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒 with ROX

### User Manual

Catalog Number	MB000-3071	200 rxn
	MB000-3072	400 rxn
	MB000-3073	2000 rxn



## 产品概述

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 Real Time PCR 的专用试剂。本产品采用对 DNA 聚合酶进行化学修饰的方法实现 PCR 反应的热启动酶，配以 Real Time PCR 用最适 Buffer，可以有效抑制非特异性的 PCR 扩增，从而显著提高 PCR 反应的扩增效率，适用于进行高灵敏度的 Real Time PCR 扩增反应。

本产品中含有 Real Time PCR 反应检测用的最适浓度 SYBR Green I，是一种 2×预混合试剂，进行实验时，PCR 反应液的配制十分方便简单。

ROX 一般用于 Life Technologies 等公司的 Real Time PCR 扩增仪上，以调整 PCR 加样误差所引起的 PCR 管与管之间的差异。

使用本产品进行 Real Time PCR 反应，可以在宽广的定量区域内得到良好的标准曲线，对靶基因进行准确定量、检测，重复性好，可信度高。

## 产品应用

Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System 和 StepOnePlus 使用 ROX Reference Dye(50X); 7500 Real-Time PCR System 和 7500 Fast Real-Time PCR System 使用 ROX Reference Dye II(50X); Thermal Cycler Dice Real Time System II、LightCycler/ LightCycler480 System(Roche Diagnostics) 或 CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)等 Real Time PCR 扩增仪不必使用。

## 产品组分及储存条件

Components	MB000-3071	MB000-3072	MB000-3073
HotStart SYBR Green qPCR Master Mix	2 X 1.25ml	4 X 1.25ml	20 X 1.25ml
ROX Reference dye(50X)	100µl	200µl	1ml
ROX Reference dye II(50X)	100µl	200µl	1ml
Serial ddH <sub>2</sub> O	2 X 1.5 ml	4 X 1.5 ml	20 X 1.5 ml

**保存条件：** 本产品须避光保存，保存和配制 PCR 反应液时避免强光照射；于-20℃保存。

**有效期：** 1 年；若经常使用，请放置在 4℃。

运输条件：运输请保持 0-8℃。

## 1 实验流程

用户需自备的试剂：DNA 模板、引物

操作示例：以 25  $\mu$ l PCR 反应体系为例，使用前请上下颠倒以混匀 Mix。

### 1. PCR 反应体系的建立：

DNA 模板*	1ul
正向引物 (10 $\mu$ M)	1ul
反向引物 (10 $\mu$ M)	1ul
ROX Reference dye(50X) or	0.5 ul
ROX Reference dye II(50X) (可选)	
2xHotStart SYBR Green qPCR Maste	12.5ul
Mix	
ddH <sub>2</sub> O	8ul

模板量：10~1000 ng 基因组 DNA，1~30 ng 质粒，或 1~2  $\mu$ l RT-PCR 反应后的 cDNA。

注意：本产品对模板 DNA 扩增灵敏度极高,建立反应体系时加入模板的量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。因此在加入模板时将模板稀释以大体积加入反应体系中，这样可以有效避免吸取模板量不准确给实验带来的影响，提高实验的可重复性。

以上举例为常规 PCR 反应系统，仅供参考。实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异，需根据模板、引物、目的片段的特点设定最佳反应条件，并根据比例放大或缩小反应体系。

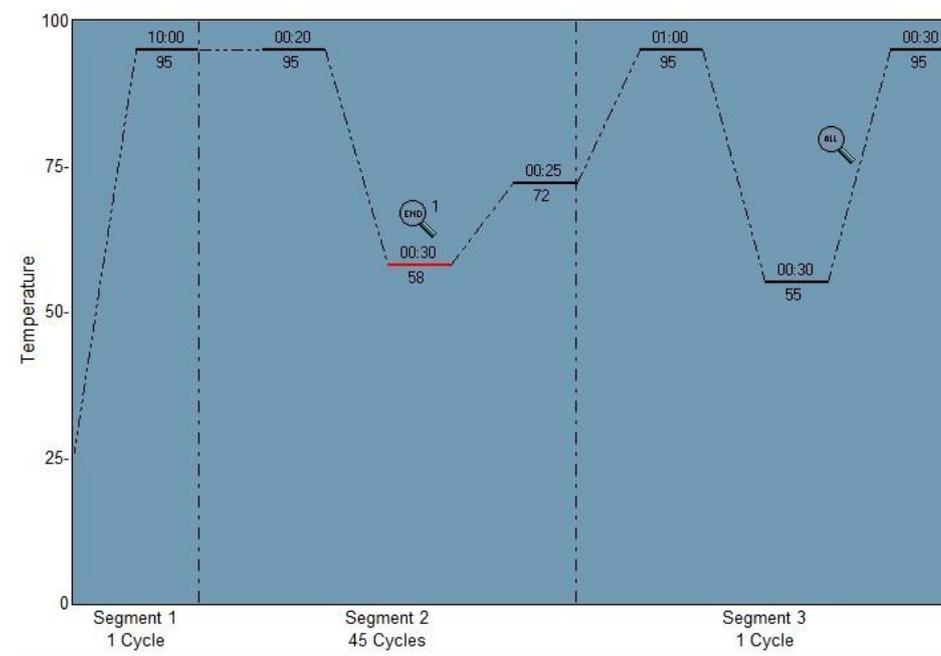
### 2. Real Time PCR 反应：

本产品采用三步法 PCR 反应程序能得到较好的结果。产品中的 DNA 聚合酶需要热激活处理以恢复酶活，请设置 PCR 反应预变性条件为 94-95℃ 10 分钟。如果模板的 GC 含量很高，可将这个过程时间需延长至 15 分钟，为得到最佳结果，可对不同的模板采用梯度 PCR 优化反应条件。以下为推荐您使用的三步法 Real Time PCR 程序设置：

Segment 1: PCR 反应预变性阶段。

**Segment 2:** RealtimePCR 反应阶段。58°C退火时间请根据您的 Real Time PCR 仪所需要的数据采集最短时间限制自行调整；退火温度、72°C延伸时间请根据您的引物最佳退火温度及产物长度自行调整。

**Segment 3:** 扩增产物融解曲线信息采集阶段。



### 3.实验结果分析:

反应结束后确认 Real Time PCR 的扩增曲线及融解曲线，进行标准曲线制作等。PCR 扩增产物特异与否也可用琼脂糖凝胶电泳进行确认。

### 备注

在确认本产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。